

Partial translation of Cited Document 2
Page 1 of 2

JP-A H3-272692

(1)

Claims

1. A method for producing highly unsaturated fatty acids, said method comprising:
culturing a microorganism capable of producing arachidonic acid in a medium to
which an alkene substrate has been added,
or
adding an alkene substrate to a solution in which said microorganism is being
cultured and culturing further to produce highly unsaturated fatty acids or a lipid
comprising highly unsaturated fatty acids,
and
extracting the highly unsaturated fatty acids.

(2)

[Detailed Description]

The present invention can use any microorganism capable of producing arachidonic acid, and capable, on addition of an alkene substrate, of producing novel highly unsaturated fatty acids that preserve the substrate's double bond. Such organisms include, for example, microorganisms from the families Mortierella, Conidiobolus, Pythium, Phytophthora, Penicillium, Cladosporium, Mucor, Fusarium, Aspergillus, Rhodotorula, Entomophthora, Echinoporangium and Saprolegnia. Examples from the Mortierella family include Mortierella ellongata IFO 8570, Mortierella exigua IFO 8571, Mortierella hygrophila IFO 5941, and Mortierella alpina IFO 8568. All of these strains can be obtained without restriction from the Institute for Fermentation, Osaka.

Further, Mortierella ellongata SAM 0219 strain, which the present inventors isolated from soil (FERM P-8703)(FERM BP-1239), can also be used.

(3)

To culture strains for use in the present invention, the spores, hyphae or pre-culture liquid obtained by culturing the strains in advance are inoculated into a liquid or solid medium and cultured. When using a liquid medium, the carbon source can be any in general use, for example, glucose, fructose, xylose, saccharose, maltose, soluble starch, molasses, glycerol, mannitol and so on, without limitation. As the nitrogen source, in addition to natural nitrogen sources such as peptone, yeast extract,

Partial translation of Cited Document 2
Page 2 of 2

wheat germ extract, meat extract, casamino acids, corn steep liquor and so on, organic nitrogen sources such as urea, and inorganic nitrogen sources such as sodium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulfate and so on can be used. In addition, as necessary, inorganic salts such as phosphates, magnesium sulfate, iron sulfate, and copper sulfate, as well as vitamins and so on can also be used as trace nutrient sources. These medium constituents are not especially limited, so long as they are not at a concentration that inhibits growth of the microorganisms. Practically, the concentration of the carbon source is generally 0.1 to 30% by weight, and preferably 1 to 10% by weight, and the nitrogen source is 0.01 to 5% by weight, and preferably 0.1 to 2% by weight.

When culturing on a solid medium, cultivation is performed for 3 to 14 days at 5 to 40°C, and preferably 20 to 30°C, using wheat bran, rice hull, or rice bran containing 50 to 100% by weight of water relative to the weight of the solid substances. In such cases, nitrogen sources, inorganic salts, and trace nutrient sources can be added to the medium as necessary.

Searching PAJ

<http://www19.ncl.ncl.go.jp/PA1/result/detail/ma...>English Abstract 1
of Cited Document 2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-272692

(43)Date of publication of application : 04.12.1991

(51)Int.CI.

C12P 7/64

(21)Application number : 02-071879 (71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 23.03.1990 (72)Inventor : YAMADA HIDEAKI
SHIMIZU AKIRA
AKIMOTO KENGO
SHINMEN YOSHIJI

(54) NEW HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID AND PRODUCTION OF SAME FATTY ACID OR LIPID CONTAINING SAME FATTY ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the title fatty acid useful as a drug, etc., in high yield by culturing a fungus capable of producing arachidonic acid in a medium containing an alkene substrate and forming a highly unsaturated fatty acid or a lipid containing the fatty acid.

CONSTITUTION: A fungus [e.g. *Mortierella elongata* SAM0,219 (FERM P-8,703) OR (FERM P-1,239)] is cultured in a medium containing an alkene substrate or the alkene substrate is added to a culture solution in which the fungus is being cultured and further the fungus is cultured so that a highly unsaturated fatty acid (e.g. 9,17-octadecadienoic acid) or a lipid containing the fatty acid is formed to give the objective fatty acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted]

Searching PAJ

<http://www19.indl.ncipi.go.jp/PA1/result/detail/ma...>

[registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

Fited Document 2

⑨日本国特許庁 (JP)

⑩特許出願公開

⑪公開特許公報 (A) 平3-272692

⑫Int.Cl.⁵

C 12 P 7/64

識別記号

府内整理番号

⑬公開 平成3年(1991)12月4日

8114-4B

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全11頁)

⑭発明の名称 新規高度不飽和脂肪酸並びに該脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法

⑮特 願 平2-71879

⑯出 願 平2(1990)3月23日

⑰発明者 山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

⑰発明者 清水 昌 京都府京都市中京区西の京伯楽町14

⑰発明者 秋元 健吾 大阪府三島郡島本町広瀬1-12-22

⑰発明者 新免 芳史 京都府乙訓郡大山崎町字円明寺小字鳥居前8-1 S-304

⑰出願人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

⑰代理人 弁理士 齊木 朗 外4名

明細書

1. 発明の名称

新規高度不飽和脂肪酸並びに該脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法

(1) 2. 特許請求の範囲

1. アラキドン酸生産能を有する微生物を、アルケン基質を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にアルケン基質を添加してさらに培養することにより高度不飽和脂肪酸、又は高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そして高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とする高度不飽和脂肪酸の製造方法。

2. アラキドン酸生産能を有する微生物を、アルケン基質を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にアルケン基質を添加してさらに培養し、そして高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を採取することを特徴とする高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の製造方法。

3. アルケン基質が①末端(ω1)、②又は③に二重結合を有する炭化水素、脂肪酸、脂肪

酸塩もしくは脂肪酸エステルまたはこれらを構成成分として含む油脂であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

4. 新規高度不飽和脂肪酸が9,12,17-オクタデカトリエン酸、6,9,12,17-オクタデカテトラエン酸、8,11,14,19-エイコサテトラエン酸、又は5,8,11,14,19-エイコサペンタエン酸であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

5. 胡麻油及び/又は落花生油を添加した培地で前記微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培地に胡麻油及び/又は落花生油を添加してさらに培養することにより、8,11,14,19-エイコサテトラエン酸又は8,11,14,19-エイコサテトラエン酸、又は8,11,14,19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を採取することを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

6. 胡麻油に対して対して実質的に非混和性である有

機溶剤により胡麻油を抽出して得た抽出物を添加した培地で前記微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培地に前記抽出物を添加してさらに培養することにより、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を高比率で生成せしめ、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を採取することを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

7. セサミン、セサミノール、エビセサミン又はエビセサミノールを単独で又は組み合わせて添加した培地で前記微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培地にセサミン、セサミノール、エビセサミン又はエビセサミノールを単独で又は組み合わせて添加してさらに培養することにより、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を高比率で生成せしめ、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、又は8, 11, 14,

19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を採取することを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

8, 9, 12, 17-オクタデカトリエン酸、6, 9, 12, 17-オクタデカテトラエン酸、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、及び5, 8, 11, 14, 19-エイコサベントエン酸から成る群から選択された脂肪酸。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は醣酵法による3つ以上の二重結合を有し、その内ひとつがメチル基側から数えて1, 2、又は3番目の位置に存在し、好ましくは炭素数16~22を有する新規高度不飽和脂肪酸の製造方法に関する。

【従来技術】

アーリノレン酸、ジホモーアーリノレン酸、アラキドン酸等の高度不飽和脂肪酸は、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン等の

エイコサノイドの前駆体となり得る他、その脂肪酸自身のもつ生理活性からも注目されている。しかしながら、高度不飽和脂肪酸の構造を保持しながら他の粗体、例えばタンパク質等への修飾、ジカルボン酸への交換等を行うことができなかった。そこで、高度不飽和脂肪酸のメチル基末端側に二重結合を有せば、構造に大きな変化を与えることなく利用することが期待されるが、このような新規高度不飽和脂肪酸の製造方法は全く知られていない。このため、新規高度不飽和脂肪酸の生産効率の高い製造法の開発が強く望まれている。

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、安価な常用の培地を用いて効率よく新規高度不飽和脂肪酸を製造することができる方法を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記の目的を達成するため種々研究した結果、アラキドン酸を生産する能力を有

する微生物を、培地又は培養中の培養液にアルケン基質、例えば ω 1、 ω 2又は ω 3に二重結合を有する炭化水素、脂肪酸、脂肪酸塩もしくは脂肪酸エステルまたはこれらを構成成分として含む油脂を添加して培養した場合に、アルケン基質の二重結合を保持する新規高度不飽和脂肪酸の頭著な生産が認められるという全く新しい知見を得た。

従ってこの発明は、アラキドン酸生産能を有する微生物をアルケン基質を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にアルケン基質を添加してさらに培養することによりアルケン基質の二重結合を保持する新規高度不飽和脂肪酸又は新規高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を生成せしめ、そして新規高度不飽和脂肪酸を採取することを特徴とする新規高度不飽和脂肪酸の製造方法、及びアラキドン酸生産能を有する微生物をアルケン基質を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にアルケン基質を添加してさらに培養し、そして

特開平3-272692(3)

アルケン基質の二重結合を保持する新規高度不飽和脂肪酸を含有する脂質を採取することを特徴とする新規高度不飽和脂肪酸を含有する脂質の製造方法を提供しようとするものである。

本発明者はさらに、前記の製造方法において、例えは1に二重結合を有する基質を用いた場合、胡麻油及び/又は落花生油、胡麻油の有機溶剤抽出物、あるいは該抽出物中の有効性分であるセサミン、セサミノール、エピセサミン及び/又はエピセサミノールの存在下で前記微生物を培養した場合、5, 8, 11, 14, 19-エイコサペンタエン酸の生産が抑制され、その前駆体である8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸の生産が増加することを見出した。

従って、本発明の前記の方法の一つの態様においては、胡麻油及び/又は落花生油を添加した培地で前記微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培地に胡麻油及び/又は落花生油を添加してさらに培養することにより、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸又は8, 11, 14,

19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を高比率で生成せしめ、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を採取するか；あるいは、

胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤により胡麻油を抽出して得た抽出物を添加した培地で前記微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培地に前記抽出物を添加してさらに培養することにより、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を高比率で生成せしめ、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を採取するか；あるいは、

セサミン、セサミノール、エピセサミン又はエピセサミノールを単独又は組み合わせて添加した培地に前記微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培地にセサミン、セサミノール、エピセサミン又はエピセサミノールを単独で又は組み合わせて添加してさらに培養すること

により、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を高比率で生成せしめ、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、又は8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質を採取する。

本発明はさらに、8, 12, 17-オクタデカトライエン酸、6, 9, 12, 17-オクタデカテトラエン酸、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸、及び5, 8, 11, 14, 19-エイコサペンタエン酸から成る群から選択される新規脂肪酸を提供する。

(2) 【具体的な説明】

本発明においては、アラキドン酸生産能を有し、アルケン基質の添加により、基質の二重結合を保持する新規高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物として、例えはモルティエレラ (*Mortierella*) 属、コニディオボラス (*Conidio-bolus*) 属、フィチウム (*Pythium*) 属、フィトフ

トラ (*Phytophthora*) 属、ペニシリューム (*Penicillium*) 属、クラドスボリューム (*Cladosporium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フザリューム (*Fusarium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロードトルラ (*Rhodotorula*) 属、エントモフトラ (*Entomophthora*) 属、エキノスボランジウム (*Echinosporangium*) 属、サブロレグニア (*Saprolegnia*) 属に属する微生物を挙げることができる。モルティエレラ属では例えは、モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IFO 8570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IFO 8571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IFO 5941、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IFO 8568等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、財団法人菌種研究所からなんら制限なく入手することができる。

また、本発明者らが土壌から分離した菌株モルティエレラ・エロンガタ SAM 0219 (微生物菌種等 8703号) (微生物菌種等 1239号) を使用することも

できる。

アラキドン酸生産能を有する微生物をアルケン基質を添加した培地で培養して得られる新規高度不飽和脂肪酸は、例えば9,17-オクタデカジエン酸、9,12,17-オクタデカトリエン酸、6,9,12,17-オクタデカテトラエン酸、8,11,14,19-エイコサテトラエン酸、5,8,11,14,19-エイコサペンタエン酸等を挙げることができる。上記の新規高度不飽和脂肪酸は α 1に二重結合を有するアルケン基質を用いた場合に生産される。したがって、アルケン基質の種類をかえれば、全く別の新規高度不飽和脂肪酸を製造することができる。

(3) 本発明に使用される菌株を培養するには、その菌株の胞子、菌子、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているも

のが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カゼミノ酸、コーンスティブリカ等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。

固体培地で培養する場合は、固体物重量に対して50~100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5~40℃、好ましくは20~30℃の温度において、3~14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

本発明の一つの方法は、本来アラキドン酸生産能を有する微生物を、アルケン基質の存在下で培養することにより新規高度不飽和脂肪酸を蓄積せしめることを特徴とするものである。この場合のアルケン基質とは、例えば α 1に二重結合を有する炭化水素（アルケン：1-テトラデセン、1-ペントデセン、1-ヘキサデセン、1-ヘプタデセン、1-オクタデセン、1-ノナデセン、1-エイコセン等）、 α 1に二重結合を有する脂肪酸（1-テトラデセン酸、1-ペントデセン酸、1-ヘキサデセン酸、1-ヘプタデセン酸、1-オクタデセン酸、1-ノナデセン酸、1-エイコセン酸等）、 α 1に二重結合を有する脂肪酸塩及びエステル、又は α 1に二重結合を有する脂肪酸が構成成分として含まれる油脂等、さらに α 1に二重結合を有するアルコール（13-テトラデセン-1-オール、14-ペントデセン-1-オール、15-ヘキサデセン-1-オール、16-ヘプタデセン-1-オール、17-オクタデセン-1-オール、18-ノナデセン-1-オール、19-エイコセン-

1-オール等）を挙げることができるが、これに限られるものではなく、 α 2、 α 3に二重結合を有する同様の基質も含まれる。アルケン基質の総添加量は培地に対して0.001~10重量%、好ましくは0.5~10重量%である。これらのアルケン基質は生産微生物を接種する前又はその後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。又、アルケン基質を唯一の炭素源として培養してもよく、この場合得られる脂肪酸の大部分は新規高度不飽和脂肪酸類となる。

本発明の一つの態様においては、胡麻油及び/又は落花生油、胡麻油の有機溶剤抽出物、胡麻種子の有機溶剤抽出物、あるいは該抽出物中の有効成分であるセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)3,7-ジオ

特開平3-272692(5)

キサビシクロ [3.3.0] オクタン、2,6-ビス- (3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) -3,7-ジオキサビシクロ [3.3.0] オクタン及び/又は2- (3,4-メチレンジオキシフェニル) -6- (3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ) -3,7-ジオキサビシクロ [3.3.0] オクタン等のリグナン類化合物の存在下で前記微生物を培養することにより、例えば1に二重結合を有する基質を用いた場合、8,11,14,19-エイコサテトラエン酸、又は8,11,14,19-エイコサテトラエン酸を含有する脂質が高比率で製造される。

この場合の胡麻油及び落花生油は粗製品でも精製品でもよい。胡麻油の有機溶剤抽出物の調製は、胡麻油とは実質的に非混和性であり且つ有効成分を抽出・溶解することができる種々の有機溶剤を用いて行うことができる。このような有機溶剤として、例えばアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、メタノール、エタノール等を挙げることができる。有効成分を含有する抽出物を得

るには、例えば胡麻油と上記の溶剤のいずれかとを均一に混合した後、低温下に静置し、遠心分離等の常法に従って相分離を行い、溶剤画分から溶剤を蒸発除去することにより得られる。本発明によれば、この様にして調製される抽出物中に含まれるセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール等のリグナン類化合物を単独で、又はいずれか2種類以上を組み合わせて使用することもできる。

これらはいずれも既知化合物であり商業的に入手することができる。また、これらの化合物を胡麻油抽出物から得るためには、前記のようにして得られる抽出物をカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶、蒸留等の常法に従って処理することにより目的とする化合物を単離すればよい。

添加物の量はおよそ次の通りである。胡麻油又は落花生油、あるいはこの両者の総添加量は培地に対して0.001~10重量%、好ましくは0.5~10重量%である。胡麻油の抽出物を添加する場合、

その添加量は培地に対して 3×10^{-3} ~ 3×10^{-1} 重量%である。また、セサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノールを単独で又は組合せて加える場合、総添加量は培地に対して 1×10^{-3} ~ 1×10^{-1} 重量%である。これらの胡麻油、落花生油あるいは含有物は生産微生物を接種する前又はその直後に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。

培養温度は5~40℃、好ましくは20~30℃とし、培地のpHは4~10、好ましくは6~9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2~10日間行う。

このようにして培養して、菌体内に新規高度不飽和脂肪酸を大量に含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、例えば、次のようにして新規高度不飽和脂肪酸の採取を行う。

培養終了後、培養液より遠心分離及び遠心等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度の新規高度不飽和脂肪酸を含有した脂質が得られる。

また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び/又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、各種新規高度不飽和脂肪酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することができるが、低級アルコールとのエステル、例えば9,17-オクタデカジエン酸メチル、9,12,17-オクタデカトリエン酸メチル、8,9,12,17-オクタデカテトラエン酸メチル、8,11,14,19-エイコサテトラエン酸メチル、5,8,11,14,19-エイコサペンタエン酸メチル等として分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸等（これらも、新規高度不飽和脂肪酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、新規高度不飽和脂肪酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸5~10%、BP、メタノール10~50%等により、室温にて1~24時間処理するのが好ましい。

前記の処理液から新規高度不飽和脂肪酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。この混合物中には、目的とする新規高度不飽和脂肪酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等の脂肪酸メチルエステル混合物から新規高度不飽和脂肪酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、原素包接法、液々交流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離された各種新規高度不飽和脂肪酸メチルから新規高度不飽和脂肪酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

又、新規高度不飽和脂肪酸をそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2~3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

1-ヘキサデセン4%又は1-オクタデセン4%と酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0) 2mLを10mLのエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IFO 8568の胞子液100μLをそれぞれの培地に加え、レシプロジェーカー(110rpm)により28℃で7日間振盪培養した。培養後、遠心により固体を回収し、十分水洗した後、遠心エバポレーター(60℃、2時間)で乾燥させ、そして、塩化メチレン2mL、無水メタノール-塩酸(10%) 2mL加え、50℃で3時間処理すること

によってメチルエステル化し、ヨー-ヘキサン4mL、水1mLを加え、2回抽出し溶媒を遠心エバポレーター(40℃、1時間)で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルを下記の分析条件にてガスクロマトグラフィーで分析した。

分析条件:

本体: GC-9A(株式会社島津製作所)

検出器: 水素炎イオン化検出器

カラム: ガラスカラム(内径3mm)

充填剤: 5% Advance, DS on 80/100 メッシュ Chromosorb W(株式会社島津製作所)

試料注入温度: 240℃

カラム温度: 190℃

キャリヤーガス: 窒素(流量65mL/分)

偶数組の1-アルケン[1-ヘキサデセン(C_{10})、1-オクタデセン(C_{18})]を培地に添加することによって、 $\omega 1$ に二重結合を有する新規高度不飽和脂肪酸を大量に生産することができた。

各脂肪酸は、得られた脂肪酸メチルエステルを

特開平3-272692(7)

高速液体クロマトグラフィー〔逆相カラム(5 C₁₈)、溶離液にアセトニトリル-水(85:15)を使用〕で分取することにより単離した。第1表に脂肪酸の生産量及び生成物の質量分析の結果を示す。また第1図に1-ヘキサン添加のもとで生成した脂肪酸のガスクロマトグラフィーのチャートを示した。1-オクタゼン添加時も同様のチャートが得られた。

第1表

1-アルケンを基質にしたとき生産される各脂肪酸の培地当たりの生産量(ug/L)

添加基質 生成 脂肪酸	1-ヘキサ デセン C ₁₆ =	1-オクタ デセン C ₁₈ =	質量分析 (m/z)
① 18:0	798	1559	
② 18:0	126	468	
③ 18:1	685	1070	
④ 18:2	510	521	
⑤ 18:3 τ	235	270	
⑥ 20:3	153	233	
⑦ 20:4	194	1261	
⑧ 14:1°	342	65	
⑨ 16:1°	1054	457	
⑩ 18:1°	145	279	
⑪ 18:3°	trace	trace	292
⑫ 18:4°	59	54	290
⑬ 20:4°	trace	trace	318
⑭ 20:5°	126	108	316

16:0 バルミチン酸
18:0 ステアリン酸
18:1 オレイン酸
18:3 τ テリノレン酸
20:3 ジホモーテリノレン酸
20:4 アラキドン酸
14:1° 13-テトラデセン酸
16:1° 15-ヘキサデセン酸
18:1° 17-オクタデセン酸
18:4° 6,9,12,17-オクタデカヘキサエン酸
20:4° 8,11,14,19-エイコサヘキサエン酸
20:5° 5,8,11,14,19-エイコサペンタヘキサ酸

なお、第1表に示した化合物20:5°のNMRデータは以下の通りであった。

H-NMR(CD₃Cl₂)

1.46ppm (m, 2H, CH₂)
1.68ppm (m, 2H, CH₂)
2.08ppm (m, 6H, CH₂)
2.30ppm (t, 2H, CH₂)

2.82ppm (m, 6H, CH₂)
3.63ppm (s, 3H, CH₃)
4.98ppm (m, 2H, C=C)
5.37ppm (m, 8H, C=C)
5.83ppm (m, 1H, C=C)

実施例2

1-ペントデセン4%又は1-ヘプタデセン4%と酵母エキス1%を含む培地(pH 6.0) 2mLを10mLのエルレンマイヤーフラスコに入れ、120°Cで20分間殺菌した。モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IPO 8588の胞子液 100μLをそれぞれの培地に加え、レシプロショーカー(110rpm)により28°Cで7日間振盪培養した。培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。(分析は実施例1と同条件で行った。)

奇数鎖の1-アルケン(1-ペントデセン(C15)、1-ヘキサデセン(C17))を培地中に

添加することによって、各種の^ω1に二重結合を有する奇数鎖新規高度不飽和脂肪酸を大量に生産することが認められた。

さらに、各脂肪酸メチルエステルを実施例1と同様の方法により単離した。第2表に各脂肪酸の生産量を示す。また、第2図に1-ペントデセン添加のもので生成した脂肪酸のガスクロマトグラフィーのチャートを示す。1-ヘプタデセン添加時も同様のチャートが得られた。

第2表

1-アルケンを基質にしたとき生産される各脂肪酸の培地当たりの生産量 (mg/2L)

生成脂肪酸	添加基質 1-ペント デセン C15=	1-ヘプタ デセン C17=
① 14: 0	33	trace
② 15: 0	150	573
③ 15: 1° +16: 0	169	346
④ 17: 0	79	515
⑤ 17: 1	91	812
⑥ 17: 1°	60.8	250
⑦ 18: 1	103	497
⑧ 19: 0	11	98
⑨ 18: 2	48.5	112
⑩ 19: 1° +19: 1	43	203
⑪ 18: 3 T	33.9	163
⑫ 19: 2° +19: 2	21	118
⑬ 19: 3° +19: 3	26	143
⑭ 19: 4° +19: 4	97	243
⑮ 20: 3	trace	85.3
⑯ 20: 4	234	299

- 14: 0 テトラデカン酸
- 15: 0 ペンタデカン酸
- 16: 0 バルミチン酸
- 17: 0 ヘプタデカン酸
- 17: 1 9-ヘプタデセン酸
- 18: 1 オレイン酸 19: 0 ノナデカン酸
- 18: 2 リノール酸
- 18: 3 T. テリノレン酸
- 19: 3 8, 11, 14-ノナデカトリエン酸
- 19: 4 5, 8, 11, 14-ノナデカテトラエン酸
- 20: 3 ジホモテリノレン酸
- 20: 4 アラキドン酸
- 15: 1° 14-ペントデセン酸
- 17: 1° 16-ヘプタデセン酸
- 19: 1° 18-ノナデセン酸
- 19: 3° 11, 14, 18-ノナデカトリエン酸
- 19: 4° 8, 11, 14, 18-ノナデカテトラエン酸

実施例3

1-ヘキサデセン4%及び酵母エキス1%を含む培地 (pH 6.0)、1-ヘキサデセン4%、酵母

エキス1%及びセサミン0.01%を含む培地 (pH 6.0) 2 mLを10 mLのエルレンマイヤーフラスコに入れ、120°Cで20分間殺菌した。モルティエレラ・アルビナ (*Mortierella alpina*) IFB 8568の胞子液 100 μLをそれぞれの培地に加え、リシプロシェーカー (110 rpm) により28°Cで7日間振盪培養した。実施例1と同様に遠心、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。第3表にその結果を示す。

特開平3-272692(9)

第3表

添加基質 生成 脂肪酸	セサミン 無添加	セサミン 添加
8, 11, 14, 19- エイコサテトラエン酸(20:4*)	trace	69
5, 8, 11, 14, 19-エイコサベシ タエン酸(20:5*)	126	59
ジホモーテーリノ レン酸(20:3)	153	383
アラキドン酸 (20:4)	794	511

(mg/L)

第3表より明らかのように、セサミンを培地に、あるいは培養中の培養液に添加することにより、5, 8, 11, 14, 19-エイコサベニタエン酸の生産が押さえられ、8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸が大量に生産された。この結果は、「ビスホモーテーリノレン酸及びこれを含有する脂質の製造方法」と題する発明(特開平1-243992)の明細書に記載されていると、同様の効果によ

り目的脂肪酸の大量生産が起こることは明らかであり、胡麻油の含有物であるセサミン以外に、胡麻油及び/または落花生油、胡麻油の有機溶剤抽出物、胡麻種子の有機溶剤抽出物、あるいは該抽出物中の有効成分であるセサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、2, 6-ヒス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン及び/又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン等のリグナン誘導体が8, 11, 14, 19-エイコサテトラエン酸の大量生産に作用するのは明らかである。

実施例4

グルコース1%、酵母エキス1%及び1-ヘキサセン3%を含む培地(pH 6.0) 2mLを10mLの

エルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。コンディオボラス・ヘテロスボラス(*Conidiobolus heterosporus*) CBS 138.57、フィチウム・イレグラム(*Pythium irregularare*) CBS 494.86、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*) IFO 4872、エントモフトラ・イグノビリス(*Entomophthora ignobilis*) CBS 181.60、ペニシリューム・シアネウム(*Penicillium cyaneum*) IFO 5337、クラドスボリューム・ヘルブラム(*Cladosporium herbarum*) IFO 30314、ムコール・アンビガス(*Mucor ambiguus*) IFO 6742、アスペルギルス・カンディダス(*Aspergillus candidus*) IFO 8816、ロードトルラ・グラチニス(*Rhodotorula glutinis*) IFO 0695、フザリューム・オキソボラム(*Fusarium oxysporum*) IFO 5942、エキノスボランジウム・トランスバーサリス(*Echinosporangium transversalis*) NRRL 3116、サブロレギニア・パラシティカ(*Saprolegnia parasitica*) CBS 540.67を培地に1白金耳を接種し、レシプロショーカー(110rpm)により28℃で

7日間振盪培養した。実施例1と同様に、濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。第4表にその結果を示す。

アラキドン酸生産菌をアルケン基質を添加した培地で培養することにより新規高度不飽和脂肪酸の生産が認められた。

第4表

アラキドン酸生産菌の培地当たりの 5, 8, 11,
14, 19-エイコサペンタエン酸(20:5^o) 生産量

生産株	20:5 ^o (mg/l)
コニディオボラス・ヘテロスボラス	24.6
フィチウム・イレグラレ	10.0
フィトフトラ・インフェスタンス	4.4
エントモフトラ・イグノビリス	5.7
ベニシリューム・シアネウム	3.6
クラドスピリューム・ヘルプラム	6.3
ムコール・アンビガス	2.1
アスペルギルス・カンディダス	1.6
ロードトルラ・グラテニス	3.0
フザリューム・オキソボラム	1.7
エキノスボランジウム・ トランスバーサリス	13.8
サプロレグニア・パラシティカ	2.2

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1において1-ヘキサデセンの添

加のもとで生成した脂肪酸のガスクロマトグラフィー-チャートを示す。図中の番号は第1表中の生成脂肪酸番号に対応する。

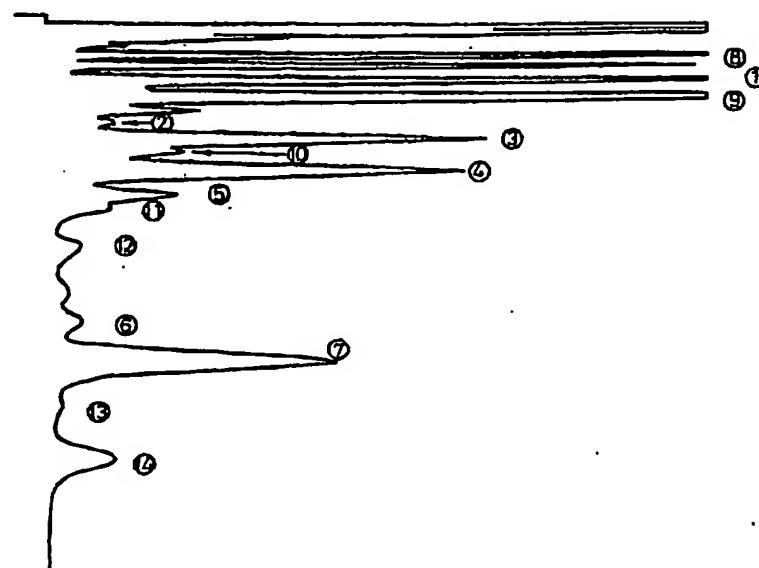
第2図は実施例2において1-ペンタデセンの添
加のもとで生成した脂肪酸のガスクロマトグラフィー-チャートを示す。図中の番号は第2表中の生成脂肪酸番号に対応する。

特許出願人

サントリー株式会社

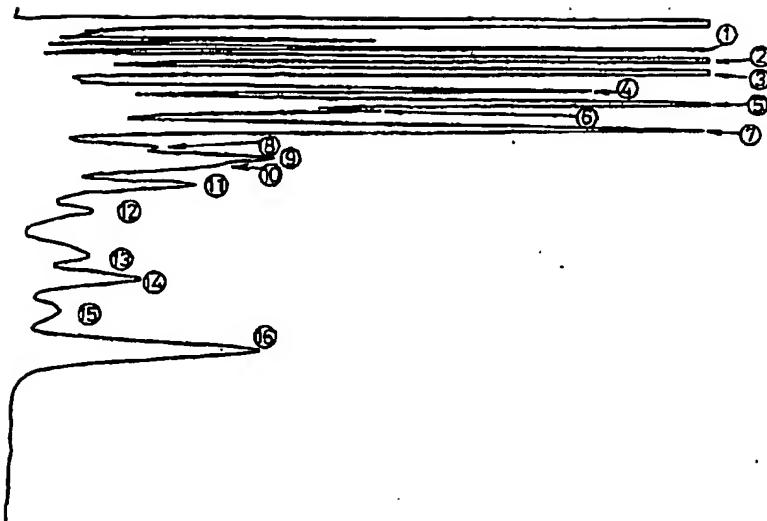
特許出願代理人

弁理士 青木 朗
弁理士 石田 敏
弁理士 福本 積
弁理士 山口 昭之
弁理士 西山 雅也



第1図

特開平3-272692(11)



第2図

Partial translation of Cited Document 3
Page 1 of 2

JP-A S63-68090

(1)

Claim(s)

1. A method for producing a lipid containing arachidonic acid, wherein a filamentous fungus of the Mortierella family is cultured in a solid medium using a whole potato¹ to produce, in the medium, a fungus comprising a lipid comprising arachidonic acid.

(2)

[Problem to be Solved]

An aim of the present invention is to provide methods that are capable of increasing arachidonic acid content per dried fungus weight, arachidonic acid content in the lipid extracted from this fungus, and arachidonic acid content per culture medium, and producing highly pure arachidonic acid at a high yield with simple separation and purification.

[Means for Solving the Problem]

The aim of the present invention is achieved by culturing filamentous fungi of the Mortierella family that are able to produce arachidonic acid in a specific medium.

That is, the present invention features methods for producing lipids containing arachidonic acid, wherein fungi comprising lipids that comprise arachidonic acids are produced by culturing filamentous fungi of the Mortierella family in a solid medium using whole potatoes.

Examples of advantageous fungi that produce arachidonic acid and belong to the Mortierella family include those belonging to Mortierella alpina, Mortierella bainieri, Mortierella elongata, Mortierella exigua, Mortierella minutissima, Mortierella verticillata, Mortierella hygrophila, Mortierella polycephala, and Mortierella renispora. Specific examples of these fungi can include Mortierella alpina IFO 8568, ATCC 16266, ATCC 32221, ATCC 42430; Mortierella bainieri IFO 8569; Mortierella elongata IFO 8570; Mortierella exigua IFO 8571; Mortierella minutissima IFO 8573; Mortierella verticillata IFO 8575; Mortierella hygrophila IFO 5941; and Mortierella polycephala IFO 6335. These strains are filamentous fungi recorded in the strain inventory at the Institute of Fermentation, Osaka (IFO) located in Osaka, Japan, and the American Type

¹ Translation note: the term "potato" is used collectively to mean all the types of "imo" defined below.

Partial translation of Cited Document 3
Page 2 of 2

Culture Collection (ATCC) located in the U.S.A.

The above-mentioned cultures of filamentous fungi are carried out using a solid medium using whole potatoes². The types of potato that may be used as media include Irish potato, colocasia, sweet potato, cassava, taro, Jerusalem artichoke, and so on, and Irish potato is particularly suitable. The potato may or may not be peeled. To prepare the solid medium, cubed potatoes (about 1 cm cubes) are added to about 0 to 2 folds, and preferably 0 to 1 fold of water and boiled. After the potatoes are sufficiently smashed with water, about 0 to 20%, and preferably 2 to 10% of carbohydrate is added and mixed well. Examples of the carbohydrate include glucose, fructose, saccharose, molasses, liquids obtained by wood saccharification, and starch hydrolysates. By adding bivalent metals as trace additives, the yield of arachidonic acid per medium can be further increased. Examples of such bivalent metals include Ca^{++} and Mg^{++} . The amount of Ca^{++} to be added is 0.02-2g/kg, and preferably 0.05-1g/kg. The amount of Mg^{++} to be added is 0.01-5g/kg, and preferably 0.02-2g/kg.

A suitable initial pH for the culture is 4.0-7.0, and the temperature is 10-33 °C, and preferably 20-30 °C for 2 to 20 days of culture.

The aforementioned filamentous fungi can be cultured by culturing in such aerobic conditions. Since the lipid is mostly produced inside the fungal bodies, the fungal bodies are separated from the culture. After mechanical or physical grinding, extraction is performed using a solvent or supercritical carbon dioxide to obtain lipid with a high content of arachidonic acid.

The arachidonic acid content of the obtained lipids is evaluated after the usual hydrolysis, esterification, or ester exchange procedures. Since the arachidonic acid content in the lipids is high, it is much easier and more economical than conventional methods to purify the target arachidonic acid or arachidonic acid ester using solvents, chromatography fractions, urea addition separation methods and the like. The yield of arachidonic acid or arachidonic acid ester for each of the solid media is at most 13.1g/kg, a productivity of about 13 times that achieved when using liquid media.

² Translation note: Again used collectively.